

【書類名】 明細書

【発明の名称】 昆虫細胞初代培養用培地、細胞外マトリックスおよびこれらを用いた短期間の昆虫培養細胞株作出法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンパク質抽出物としてラクトアルブミン水解物、酵母抽出物およびトリプトースリン酸ブросを、粘性補助剤としてポリビニルピロリドンを含む昆虫細胞初代培養用培地。

【請求項 2】 ラクトアルブミン水解物：1000～3000mg/L、酵母抽出物：1000～3000mg/L、トリプトースリン酸ブрос：1000～3000mg/L、ポリビニルピロリドン：200～500mg/Lを含む、請求項 1 記載の昆虫細胞初代培養用培地。

【請求項 3】 ポリビニルピロリドンがポリビニルピロリドン K-90 である請求項 1 または 2 記載の昆虫細胞初代培養用培地。

【請求項 4】 化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチン。

【請求項 5】 カイコ由来である、請求項 4 記載の昆虫由来の水溶性キチン。

【請求項 6】 カイコ蛹殻由来である、請求項 5 記載の昆虫由来の水溶性キチン。

【請求項 7】 請求項 4～6 のいずれか 1 項記載の昆虫由来の水溶性キチンを含む細胞外マトリックス。

【請求項 8】 請求項 4～6 のいずれか 1 項記載の昆虫由来の水溶性キチンを 0.001%～1% 含む培養用容器コーティング用細胞外マトリックス溶液。

【請求項 9】 請求項 4～6 のいずれか 1 項記載の昆虫由来の水溶性キチンをコーティングした、昆虫細胞培養用容器。

【請求項 10】 カイコ蛹殻からキチンを抽出し、該キチンを脱アセチル化することを含む、請求項 6 記載の昆虫由来の水溶性キチンの製造方法。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の昆虫初代培養用培地および請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項記載の昆虫由来の水溶性キチンを用いる、短期間での昆虫培養細胞株の作出法。

【請求項 1 2】 請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項記載の昆虫由来の水溶性キチンをコーティングした容器を用い、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の昆虫初代培養用培地中で昆虫細胞を培養する、請求項 1 1 記載の短期間での昆虫培養細胞株の作出法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、昆虫培養細胞系の作出技術に関する。

##### 【従来技術】

昆虫も含めて、動物の培養細胞株を作出するには、2 つの段階がある。最初の段階を初代培養といい、次の段階を継代培養という。培養細胞株の作出の際、作出したい昆虫から目的とする組織を無菌的に摘出し、この組織を細胞培養用培地とともに培養用フラスコにいれ、次いで組織切片からフラスコ面に出てきた細胞が分裂して十分な数に達するまで約 1 年間培養を続ける。この十分増えた細胞を新しいフラスコに植え換え、継代培養を行う。作出された細胞株の培養が継代培養である。

従来より、種々の昆虫細胞用培地が入手可能であった。例えば、Grace 培地、IPL-41 培地、Schneider's Drosophila 用培地、Sf900II、TC-100 培地、Sf-9 細胞用培地、Sf-21 細胞用培地、Express Five 培地、EX-400 系培地等がある。また、三橋淳らは、昆虫の体液分析結果を参考にして MGM-系統等の培地を作出している (MGM-443; Mitsuhashi, J. (1980) In:Kurstak, E., Maramorosch, K. and Dubendorfer, A. (eds) Invertebrate Systems In Vitro Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam, pp47-58、MGM-448; Mitsuhashi, J. (1984) Zool. Sci. 1, 415-419、MGM-450; Mitsuhashi, J. and Inoue, H (1988) Appl. Entomol. Zool. 23, 488-490、MGM-464; Mitsuhashi, J. (2001) In Vitro Cell. Dev. Biol. 37A, 330-337、MGM-443、MGM-448、MGM-450、

MGM-464 は培地名)。

さらに、本発明者らは、MM-8 SF 培地等を作出している（今西重雄（1994）「昆虫機能実験系および昆虫細胞培養系の開発」研究成果 295、農林水産技術会議事務局編、74-84）。しかし、これらの培地は初代培養用には適さず、もっぱら作出された培養細胞株の継代、すなわち細胞株が作出されてから、その細胞の維持のために用いられている。これらの培地を用いて初代培養を行おうとした場合、細胞の増殖は良好ではなく、上述のように初代培養に約1年間もの長期間を要していた。このように、従来早期に細胞を継代培養に移すことが可能な、初代培養に適した培地は存在していなかった。また、これらの培地の多くは、昆虫の特定の種に限定して使用されていた。例えば、Schneider's Drosophila 用培地は双翅目昆虫特にショウジョウバエ細胞の培養に、Sf900II、Sf-9細胞用培地およびSf-21細胞用細胞は、鱗翅目昆虫特にシャクトリムシ細胞などを対象としていた。幅広い目の昆虫の細胞の増殖に適した培地は従来存在しなかった。

一方、一般に細胞培養に用いられるフラスコは、プラスチックを材質としており、そのプラスチック表面にコラーゲンI、II、III、IVもしくはV、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、ポリ-L-リジン、マトリゲル、EHS-ナトリックス等の細胞外マトリックスがコーティング処理されていると考えられている。これらの組成についての詳細な報告は少ないが、例えばキチン、キトサンとしては甲殻類のエビやカニから抽出した細胞外マトリックスについて報告されていた。これらのキチン、キトサンは種々の化学修飾を受けているものであった。細胞外マトリックスは組織を細胞培養用容器に付着させ、組織から遊出した細胞を容器表面に貼り付けさせ分裂・増殖させるという効果があるが、良好な細胞培養のために、より細胞付着能の高い細胞外マトリックスが望まれていた。

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、昆虫細胞初代培養に適した新規な細胞培養用培地の提供を目的とする。本発明は、また化学修飾として脱アセチル化のみされてい

る昆虫由来の水溶性キチンの提供を目的とする。本発明は、さらに前記昆虫細胞初代培養用培地および前記昆虫由来の水溶性キチンを用いる、短期間での昆虫培養細胞株の作出法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

上述のように、昆虫細胞の初代培養に適した培地、すなわち細胞培養を開始し、切断した組織片から培養フラスコの底面に出てきた細胞（初代細胞）に限定して細胞の分裂および増殖を促して、早期に継代培養に移すことを可能にする昆虫細胞用培地が切望されていた。

本発明者らは、組織片から得た細胞の分裂増殖を促し早期に継代培養に移すことを可能にする初代培養に適した培地について鋭意検討を行い、ある種のタンパク質抽出物および粘性補助剤を含む新規な培地が初代培養に適していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

また、本発明者らは、新規な昆虫細胞の培養に適した培養用容器にコーティングする新規な細胞外マトリックスについて鋭意検討を行い、昆虫由来の脱アセチル化以外の化学修飾をしていない水溶性キチンを細胞外マトリックスとして用いて細胞培養用容器をコーティングして細胞培養を行うと、組織の培養用容器への付着が良好であり、さらに組織から遊出した細胞も容器表面に張り付いて分裂・増殖することを見出し本発明を完成させるに至った。さらに、本発明者らは、昆虫由来の化学修飾をしていない水溶性キチンを細胞外マトリックスをコーティングした細胞培養用容器と初代培養に適した培地を用いることにより、より効率的に初代培養ができることを見出し本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) タンパク質抽出物としてラクトアルブミン水解物、酵母抽出物およびトリプトースリン酸ブросを、粘性補助剤としてポリビニルピロリドンを含む昆虫細胞初代培養用培地、

(2) ラクトアルブミン水解物：1000～3000mg/L、酵母抽出物：1000～3000mg/L、トリプトースリン酸ブрос：1000～3000mg/L、ポリビニルピロリドン：200～500mg/Lを含む、(1)の昆虫細胞初代培養用培地、

(3) ポリビニルピロリドンがポリビニルピロリドン K-90 である(1) または (2) の昆虫細胞初代培養用培地、

(4) 化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチン、

(5) カイコ由来である、(4) の昆虫由来の水溶性キチン、

(6) カイコ蛹殻由来である、(5) の昆虫由来の水溶性キチン、

(7) (4) ~ (6) のいずれかの昆虫由来の水溶性キチンを含む細胞外マトリックス、

(8) (4) ~ (6) のいずれかの昆虫由来の水溶性キチンを 0.001% ~ 1% 含む培養用容器コーティング用細胞外マトリックス溶液、

(9) (4) ~ (6) のいずれかの昆虫由来の水溶性キチンをコーティングした、昆虫細胞培養用容器、

(10) カイコ蛹殻からキチンを抽出し、該キチンを脱アセチル化することを含む、(6) の昆虫由来の水溶性キチンの製造方法、

(11) (1) ~ (3) のいずれかの昆虫初代培養用培地および (4) ~ (6) のいずれかの昆虫由来の水溶性キチンを用いる、短期間での昆虫培養細胞株の作出法、および

(12) (4) ~ (6) のいずれかの昆虫由来の水溶性キチンをコーティングした容器を用い、(1) ~ (3) のいずれかの昆虫初代培養用培地中で昆虫細胞を培養する、(11) の短期間での昆虫培養細胞株の作出法。

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### 1. 本発明の昆虫細胞初代培養用培地の組成

本発明の昆虫細胞初代培養用培地は、少なくともタンパク質抽出物および粘性補助剤を含む。本発明の初代細胞用培地は、さらに無機塩混合組成物、糖類組成、アミノ酸混合組成物、ビタミン混合組成物を含み得る。

タンパク質抽出物としては、少なくともラクトアルブミン水解物

(Lactoalbumine Hydrolysate)、酵母抽出物 (Yeastlate) およびトリプトースリン酸ブロス (Tryptose Phosphate Broth) を含み、さらにフェツイン、チトクローム C、イノシン、ウシ血漿アルブミン V 等を含んでいてもよい。ラクトアルブミン、酵母抽出物、およびトリプトースリン酸ブロスは、公知の手法により得ることができる。フェツインは、例えばウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum) 由来のもの、チトクローム C は例えば、ウマ心臓由来のものを用いることができる。これらのタンパク質抽出物は、すべて市販のものを用いることもできる。例えば、ラクトアルブミン水解物は、DIFCO 社製 (No. 5996) のものを、酵母抽出物は細胞培養用に調製されたものを用いることができ (TC (Tissue Culture)-酵母抽出物)、例えば DIFCO 社製 (No. 5577) のものを、トリプトースリン酸ブロスは、DIFCO 社製 (No. 0060) のものを用いることができる。さらに、フェツインは Sigma 社製 (No. F2379) のものを、チトクローム C は Sigma 社製 (No. C2506) のものを、イノシンは Wako Pure Chemical Industries, Ltd のものを用いることができる。

ラクトアルブミン水解物、酵母抽出物およびトリプトースリン酸ブロスの培地中の含有量は、それぞれ培地 1 L 当たり 500~3,000mg が好ましく、より好ましくは 1,000~3,000mg、特に好ましくは 1,000~2,000mg である。フェツインの含有量は培地 1 L 当たり 1~100mg が好ましく、より好ましくは 1~50mg、特に好ましくは 5~15mg、チトクローム C の含有量は培地 1 L 当たり 1~500mg が好ましく、より好ましくは 1~100mg、特に好ましくは 10~100mg である。また、イノシンの含有量は 1~500mg が好ましく、より好ましくは 1~200mg、特に好ましくは 10~200mg であり、ウシ血漿アルブミン V の含有量は 1000~10,000mg が好ましく、より好ましくは 100~10,000mg、特に好ましくは 1,000~10,000mg である。

本発明の初代細胞培養培地の含む粘性補助剤としては、ポリビニルピロリドンが用いられる。ポリビニルピロリドンとしては、ポリビニルピロリドン K-25、ポリビニルピロリドン K-30、ポリビニルピロリドン K-90 等があり、いずれも使用可能であるが、ポリビニルピロリドン K-90 が好

適に用いられ、和光純薬社製（同社のカタログ番号 168-03115）のものが例示できる。ポリビニルピロリドンの含有量は、培地 1 L 当たり 100 ~ 1,000mg が好ましく、より好ましくは 100 ~ 500mg、特に好ましくは 200 ~ 500mg である。

無機塩混合組成物、糖類組成物、アミノ酸混合組成物、ビタミン混合組成物としては、一般に動物細胞用培地に添加し得るものを添加すればよい。例えば、無機塩混合組成物として  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ 、 $\text{ZnCl}_2$  を含む組成物が挙げられる。糖類組成物としては、グルコース、フルクトース、スクロース、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、マルトースを含む組成物が挙げられる。アミノ酸混合組成物としては、 $\alpha$ アラニン、 $\beta$ アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、ヒドロキシプロリン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンを含むアミノ酸組成物が挙げられる。ビタミン混合組成物としては、ビオチン、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、 $\text{i}$ -イノシトール、ニコチン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミン  $\text{B}_{12}$ 、パラアミノ安息香酸を含むビタミン混合組成物が挙げられる。これらの無機塩混合組成物、糖類組成物、アミノ酸混合組成物、ビタミン混合組成物は、上述の物質を総て含んでいるのが望ましいが、一部の物質を欠いていてもよいし、また他の物質が添加されていてもよい。これらは、総て市販のものを用いることができる。また、市販の培地添加用の無機塩類組成物、糖類組成物、アミノ酸組成物およびビタミン組成物を用いてもよいし、公知の無機塩類、糖類、アミノ酸、ビタミンを主成分とする培地に上記のタンパク質抽出物および粘性補助剤を添加して用いても良い。この場合公知の培地には Grace 培地、Shneider's *Drosophila* 培地等の公知の昆虫細胞培養用培地も含まれる。さらに、培地にペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質、グ

ルタチオン等を添加しても良い。要は、少なくともラクトアルブミン水解物 (Lactoalbumine Hydrolysate)、酵母抽出物 (Yeastlate) およびトリプトースリン酸ブロス (Tryptose Phoaphate Broth) ならびにポリビニルピロリドンを含む培地である限り本発明の培地に含まれる。

さらに、本発明の培地を用いて培養を行う場合には、ウシ胎児血清等の動物血清、昆虫リンパ液等を添加して用いるのが好ましい。血清、リンパ液の添加量は数%~30%である。

本発明の昆虫細胞初代培養用培地は、ラクトアルブミン水解物 (Lactoalbumine Hydrolysate)、酵母抽出物 (Yeastlate) およびトリプトースリン酸ブロス (Tryptose Phoaphate Broth) ならびにポリビニルピロリドンを含む培地用添加剤と、その他のタンパク質抽出物混合組成物、無機塩混合組成物、糖類組成、アミノ酸混合組成物、ビタミン混合組成物を混合することにより得ることができる。従って、少なくともラクトアルブミン水解物 (Lactoalbumine Hydrolysate)、酵母抽出物 (Yeastlate) およびトリプトースリン酸ブロス (Tryptose Phoaphate Broth) ならびにポリビニルピロリドンを含む培地用添加剤も本発明の範囲に含まれる。

本発明の初代細胞培養用培地として、例えば MX 培地を挙げることができる。

本発明の初代細胞培養用培地は、純水に上述のタンパク質抽出物、粘性補助剤、無機塩混合組成物、糖類組成物、アミノ酸混合組成物およびビタミン混合組成物を溶解させて作製することができる。さらに、上述の動物血清または昆虫リンパ液を必要量添加する。必要に応じて、塩酸等の酸性溶液、水酸化ナトリウム等の塩基性溶液で pH を調整して用いる。pH は、好ましくは 6.0~7.0 であり、特に好ましくは 6.2~6.5 である。

## 2. 本発明の培地の初代細胞培養への使用

本発明の培地は、総ての昆虫細胞の初代培養に使用することができ、特に鱗翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目等に属する昆虫に適している。またこれらの昆虫の総ての組織から短期間で培養細胞株を作出することが



できる。特に、胚子組織、脂肪体組織、精巣もしくは卵巣の生殖組織、消化器系組織、神経系組織、筋肉系組織からの培養に適している。すなわち、本発明の培地を用いれば、従来困難とされていた、精巣などの組織からも短期間で培養細胞株を作出することが可能である。

昆虫から培養細胞株を作出しようとする組織を無菌的に摘出し、細胞培養用フラスコ等の適当な細胞培養用容器に本発明の培地とともに入れ、適宜培地を交換、補充して2～3ヶ月培養することにより、増殖した細胞集団を従来よりも短期間で新たなフラスコへ植え換えることができる。この際、培養条件は通常の昆虫細胞の培養条件を採用すればよく、例えば、20～28℃のインキュベータ中で培養すればよい。作出した培養細胞株は、MGM-464 培地、IPL-41 培地、グレース培地、EXCELL400 系統培地、Sf900II 培地、Schneider 培地等の公知の継代培養用培地に移して培養することが可能であり、従来の培地と比較して本発明の培地を利用することにより、速やかに継代培養に移行できる。また、そのまま本発明の培地で培養をしても良いし、また本発明の培地に添加する血清の含有量の割合を減少することによっても良好に増殖・分裂し、長期間の継代培養が可能である。

### 3. 本発明の細胞外マトリックス

本明細書において、細胞外マトリックスとは細胞培養において細胞が付着して分裂・増殖し得るマトリックス、基質、担体をいう。好適には、該細胞外マトリックスは培養用容器の細胞培養面をコーティングするのに用いる。

本発明の細胞外マトリックスは、化学修飾として脱アセチル化のみが施されている昆虫由来の水溶性キチンを主成分とする。

水溶性キチンは、総ての昆虫由来のものを用いることができる。また、昆虫の蛹の脱皮殻から抽出したものが好ましく、特にカイコの蛹の脱皮殻から抽出したものが好ましい。

本発明の水溶性キチンは、以下のようにして得ることができる。

蚕蛹脱皮殻に1N塩酸溶液を加え、窒素ガスを充満した環境下で、100℃、

20 分間処理した後、1 N 水酸化ナトリウム溶液中で 80℃、36 時間かけてタンパク質を除き、キチンを調製する。水溶性キチンの調製は、室温で濃アルカリ水溶液にキチンを溶解し、高粘度アルカリキチン水溶液を室温で長時間放置してランダムな脱アセチル化を行うことによりできる。このとき、脱アセチル化度が 45～55% の場合に限り水溶性を示す。

本発明の細胞外マトリックスに用いる水溶性キチンの調製には、水に対する親和性が高いキチンを選ぶことが望ましく、キチンの水に対する親和性は、Brunauer らの方法 (J. Amer. Chem. Soc 62. 1723-1732 (1940)) に従って評価することができる。すなわち、塩類飽和溶液の間接法により各相対湿度における吸湿量の測定を行い、BET 理論式を適用して行うことができる。本発明の細胞外マトリックスとして適したキチンの調製では、原料となるキチンの内部表面積は  $180\text{m}^2/\text{g}$  以上であることが望ましい。

すなわち、昆虫から抽出したキチンについて水に対する親和性を評価して、水に対する親和性が高いと評価されたものを本発明の細胞外マトリックスとして用いることができる。この点で、上述の昆虫の蛹、特にカイコの蛹脱皮殻由来の水溶性キチンが優れている。カイコ蛹脱皮殻から調製したキチンの内部表面積は大きく、他のカイコ由来クチクラと比べ水分子の吸着座が多い。また、吸着熱も高く、水に対する親和性は、テンサン、サクサン、セミと比べても大きい。また、カイコ蛹脱皮殻由来のキチンはカニ、エビ由来のキチンと比べても水に対する同等の親和性を有している。カイコとしては、例えば広食性蚕品種日 601 号・日 602 号×中 602 号・中 603 号（愛称しんあさざり）等を用いることができる。

このようにして得られたキチンを以下のようにして脱アセチル化することにより本発明の昆虫由来の水溶性キチンを得ることができる。

脱アセチル化は、キチンのアセチル基を除去することをいい、上述の抽出した水溶性キチンを、アルカリもしくは酸、好ましくは濃アルカリもしくは酸で処理することにより行うことができる。この際、加熱して行っても良い。また、クレメンゼン還元等の反応によっても行うことが

できる。但し、後述のようにキチンが濃アルカリに溶けることを利用して濃アルカリで処理すれば、均一系で脱アセチル化を行うことができる。

本発明のキチンは、脱アセチル化すなわち N-アセチル基を除去して用いる。従来用いられていた甲殻類由来のキチンがアシル化、トシル化、カルボキシメチル化等の種々の化学修飾を受けていたのに対して、本発明の水溶性キチンは脱アセチル化のみを受ければよい。脱アセチル化は、キチンが濃アルカリ溶液に溶けることを利用して均一系で行うのが望ましい。不均一系での反応では、キチン分子表面および非晶部分から優先的に N-アセチル基が除かれるため、N-アセチル基の分布に偏りが生じる。一方、均一系での脱アセチル化はランダムに進み、残存する N-アセチル基の分布は点在したように遍在する。その結果、キチン分子間の水素結合が弱くなるので、水溶性が発現する。すなわち、脱アセチル化度が 40～60% の範囲にある場合、部分脱アセチル化キチンは水に溶けることが報告されている (Kramer, K. J. ら、Insect Biochem. 14(3), 293-298 (1984))。

この方法に準じて、キチンを加えた高粘度アルカリ溶液を用いて均一反応系での脱アセチル化を行い、脱アセチル化度が 45～55% になるように反応条件を設定すればよい。部分脱アセチルキチンの同定は、FT-IR (フーリエ変換赤外分光法) スペクトルから調べることができる。また、脱アセチル化度の測定は、IR (赤外光) スペクトル法を用いることにより簡便に行うことができる。キチンが脱アセチル化されて部分脱アセチルキチンになると、N-アセチル基に特有なアミド基による吸収が減少するので、IR スペクトルから脱アセチル化度を推定することができる。具体的には、IR スペクトルの  $1560\text{cm}^{-1}$  のアミド I I バンドを定量用特性バンドとし、 $1070\text{cm}^{-1}$  または  $1039\text{cm}^{-1}$  のバンドを内部標準として、 $A_{1560}/A_{1070}$  の吸光度の比から測定することができる。あらかじめ脱アセチル化キチン標品を対照に作成した検量線を用いて脱アセチル化度を決定することができる。

従って、本発明の化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由

来の水溶性キチンは、昆虫から抽出された水に対する親和性の高いキチンであり、脱アセチル化度が40～60%、好ましくは45～50%のキチンである。

このようにして得られた、化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチンは、40～60%がキチンであり、残りの40～60%がキトサンの構造をしている。すなわち、化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチンは、昆虫から抽出された水に対する親和性の高いキチンであり、その40～60%がキチンとして存在しており、残りの40～60%がキトサンとして存在している物質である。細胞の膜表面はマイナス荷電に偏っているため、プラスに荷電したキトサンのアミノ基に細胞が付着して分裂・増殖し得る。この水溶性キチンを細胞外マトリックスとして用いることができる。

また、この水溶性部分脱アセチルキチンの水分吸着量は、処理前の約6倍に向上しており高い吸湿性を示し、保湿剤、吸湿剤として食品、化粧品分野において利用することもできる。

#### 4. 本発明の細胞外マトリックスの使用

本発明の水溶性キチンを水に0.001%～1%の濃度(W/V)で溶解させ、細胞培養用容器の細胞付着面を覆うように注ぎ、これを風乾して培養容器表面に付着させることにより、細胞培養容器をコーティングすることができる。例えば、細胞培養用フラスコ面200mm<sup>2</sup>当たり0.5mLのキチン水溶液を入れこれを風乾することにより良好なコーティングを達成することができる。

従って、本発明の細胞外マトリックスで容器内面の一部または総てがコーティングされた培養用フラスコ、シャーレ、プレート等の培養容器も本発明の範囲に含まれる。

このようにして、本発明の細胞外マトリックスをコーティングした細胞培養用容器を用いて昆虫細胞を培養すれば、細胞が培養容器に付着し良好に増殖・分裂を行う。

#### 5. 本発明の昆虫細胞初代培養用培地および本発明の脱アセチル化され

ている昆虫由来のキチンを用いた昆虫培養細胞株の作出

本発明の脱アセチル化されている昆虫由来のキチンをコーティングした容器を用いて、本発明の昆虫細胞初代培養用培地で昆虫培養細胞株を効率的に作出することができる。

昆虫から組織を無菌的に摘出し、この組織を本発明の脱アセチル化されている昆虫由来のキチンを細胞外マトリックスとしてコーティングした容器に、ウシ胎児血清を添加した本発明の昆虫細胞初代培養用培地とともにいれ培養を開始する。この際、細胞外マトリックスをコーティングした容器を一回無菌生理食塩水で洗浄しておくのが望ましい。昆虫としてはいかなる目の昆虫も用いることができるが、鱗翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目等に属する昆虫が適している。また、いかなる組織も用いることができるが、胚子組織、脂肪体組織、精巣もしくは卵巣の生殖組織、消化器系組織、神経系組織、筋肉系組織が適している。組織切片から培養容器表面に出てきた細胞が分裂を繰り返して十分な数に達するまで、培養を続ける。培養条件は、昆虫細胞の通常の培養条件を採用すればよい。この間、適宜、例えば1～2週間ごとに培養用容器中の培地の半分を新鮮培地と交換することにより、組織からの細胞の遊出を活発化させることができる。細胞の遊出が始まり、培養容器底面に数多くの細胞集団が形成され、その集団が大きく肥大したところに、用いるウシ胎児血清添加初代培養用培地のウシ胎児血清の含有量を徐々に低下させていく。例えば、培養開始時に30%のウシ胎児血清を添加し、細胞集団が肥大したところに20%のウシ胎児血清を添加すればよい。ついで、培地半量をMGM-464培地、IPL-41培地、グレース培地、EXCELL400系統培地、Sf900II培地、Schneider培地等の公知の継代培養用培地に交換して、継代培養を行う。適当な間隔で培地の半量ずつを交換することにより最終的に目的の継代用培地で培養することができる。

以下に、カイコの腸組織由来細胞株の作出の工程の詳細を1例として示す。

1. 無菌飼育カイコの体表を滅菌カールソン液（ペニシリン10万U単位

/100mL 0.05% ゲンタマイシン、0.05% アンチホルミンを添加) で 3 回洗  
浄する。

2. 最後のカールソン液内に 1 ~ 2 分浸漬して、カイコの動きを止める。

3. カイコの尾部を切断する。胸部の皮膚をピンセットで剥ぐ。頭部を  
ピンセットで掴んで、腸組織を引きずり出す。ペトリ皿のカールソン液  
に腸組織を浸漬する。

4. 囲腔膜をピンセットでとる。

5. エッペンチューブに入れる。

6. コラゲナーゼ I 液をエッペンチューブに入れる (4,000U/0.5g 組織  
重/コラゲナーゼ mL)。

7. 27℃、2 時間放置する。

8. 小型卓上遠心機 (チビタン (商標) など) で 10 秒間、フラッシュ遠  
心する。

9. 上清を捨て、平衡塩類液で 2 回洗浄する。

10. 強くピペッティングする。

11. 15mL のディスポーザブル遠心チューブにとり、500~800rpm で 1  
分間遠心する。

12. 上清を捨てる。再度平衡塩類液を加えて、1,000rpm、1 分間の再  
遠心上清を捨てる。細胞の集合体がペレットとして得られる。

13. MX30 培地を入れ、24 マルチウェルプレートに移して培養する。こ  
の際、あらかじめ 0.01% (W/V) 濃度キチンで培養面をコートしたプレ  
ートを用いる (特に、血球細胞系、卵巣、精巣および胚組織の初代培養  
の場合)。

14. 25℃ で培養する。

15. 培地の半量 (0.5~0.7mL) を 2 週間ごとに交換する。

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明  
はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例 1〕 昆虫細胞初代培養用培地の作製

純水に以下の物質を、培地 1 L 当たりの量が以下に示す量になるように溶解させ培地を調製した。この培地を MX 培地とした。

無機塩類混合物組成

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	507mg
$\text{NaHCO}_3$	300mg
KCl	1720mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	750mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1mg
$\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.28mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1140mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3269mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01mg
NaCl	1425mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	580mg
$(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	0.02mg
$\text{ZnCl}_2$	0.02mg

糖類組成

D-グルコース	2917mg
フルクトース	20.9mg
スクロース	11865mg
リンゴ酸	306mg
$\alpha$ -ケトグルタル酸	169mg
コハク酸	27.4mg
フマル酸	25.2mg
マルトース	500mg

アミノ酸混合物組成

L- $\alpha$ アラニン	131.5mg
------------------	---------

$\beta$ アラニン	234mg
L-アルギニン・HCl	692mg
L-アスパラギン	797mg
L-アスパラギン酸	797mg
L-シスチン	10.5mg
L-グルタミン酸	1000mg
L-グルタミン	750mg
グリシン	371mg
L-ヒスチジン	1142mg
L-イソロイシン	396mg
L-ロイシン	157mg
L-シスチン・2Na	60mg
L-ヒドロキシプロリン	400mg
L-リジン・HCl	610mg
L-メチオニン	521mg
L-フェニルアラニン	562mg
L-プロリン	396mg
DL-セリン	559mg
L-トレオニン	173mg
L-トリプトファン	91.5mg
L-チロシン	21mg
L-チロシン・2Na	180mg
L-バリン	292mg
L-ヒスチジン	1142mg

#### ビタミン混合物組成

ビオチン	0.123mg
D-パントテン酸カルシウム	0.089mg
塩化コリン	10.85mg
葉酸	0.125mg



i-イノシトール	0.285mg
ニコチン酸	0.165mg
ピリドキシン・HCl	0.285mg
リボフラビン	0.125mg
チアミン・HCl	0.125mg
ビタミン B <sub>12</sub>	0.12mg
パラアミノ安息香酸	0.245mg

#### タンパク質抽出物組成

ラクトアルブミン水解物	1500mg
TC-酵母抽出物	1500mg
トリプトースリン酸ブロス	1500mg
フェツイン	10mg
チトクローム C	50mg
イノシン	100mg
ウシ血漿アルブミン V	5000mg

#### 粘性補助剤

ポリビニルピロリドン K-90	250mg
-----------------	-------

(mg 含量 対 1000mL 培地当たり)

さらに、この調製培地にウシ胎児血清 (FBS) 20% 添加したもの (MX20 培地とする) と 30% 添加したもの (MX30 培地とする) を調製した。

調製した培地は、水酸化カリウムで pH を 6.3 に調整した。調製した培地は、ステリカップ (商標) (ミリポア社製、型番 SCGV05012) ろ過滅菌容器で滅菌して保存した。

#### 〔実施例 2〕 脱アセチル化昆虫由来水溶性キチンの調製

##### 1. 蚕脱皮殻からの水溶性キチンの調製

##### ① 調製法

広食性蚕品種 日 601 号・日 602 号×中 602 号・中 603 号 (愛称しんあさぎり) の蛹脱皮殻 5g を 1 N 塩酸溶液 300mL に入れ、窒素ガスを充満

した環境下で、100℃、20 分の処理を行い、温水、蒸留水により蛹脱皮殻を中性になるまで洗浄、真空乾燥した。次いで、乾燥した蛹脱皮殻を 1 N 水酸化ナトリウム溶液 300mL に浸漬し、80℃で 36 時間攪拌しながら蛹脱皮殻のタンパク質を除去した。この結果、0.9g のキチンが得られた。

## ② 水に対する親和性の評価

得られたキチンの吸湿性解析を、矢野、Bull、Mellon、Ashpole らの方法に従い、塩類飽和溶液の間接法により各相対湿度における吸湿量の測定を行い、BET 理論式を適用して行った。

その結果、得られたキチンの内部表面積は大きく、吸着熱も高いことから、水に対する親和性は高いと評価された。

## ③ キチンの脱アセチル化

上記の蚕脱皮殻から得られたキチン 3g を 40% 水酸化ナトリウム溶液に添加し、25℃で 70 時間放置することにより、均一溶液系で脱アセチル化を行った。収率 74% で部分脱アセチルキチンが合成された。得られた脱アセチルキチンを IR スペクトル法により分析したところ、脱アセチル化度は 45~48% であった。この部分脱アセチルキチンは、室温で水溶性を示した。水溶性部分脱アセチルキチンの飽和水蒸気圧における水の吸着量は、処理前の 6.3 倍に増加しており、高い吸湿性を発現した。

この脱アセチルキチンを細胞外マトリックスとして用いた。

### 〔実施例 3〕 細胞培養株の作出

上述の脱アセチル化された、蚕蛹脱皮殻由来の水溶性キチンの 0.01~0.1% 水溶液 0.5mL を培養用マルチプレート（住友ベークライト社製、型番 MS-8024R）の各培養穴に注ぎ、底面全体に行き渡るようにした後、常温で風乾し、液体成分を蒸発させた。その後、無菌生理食塩水を用いて培養面を一回洗浄した。

蚕幼虫から無菌的に脂肪体を摘出しその数十 mg を、上記処理し実施例 1 で調製した MX30 培地を 1.5mL（穴の底面積 200mm 平方当たり、1.5mL）入れたマルチプレートの穴中に入れ培養を開始した。14 日毎に培地の半量を交換した。30 日後に組織からの細胞の遊出が活発になり、2~3 ヶ

月後に培養面に細胞集団が数多く形成され、その集団が肥大化した。この際、顕微鏡観察により細胞がしっかりとフラスコ底面に付着しているのが観察された。そこで、培地の半分を MX20 培地に交換した。さらに、14 日ごとに MX20 培地の半分を交換し、数回交換後、細胞が十分に増殖したことを確かめて、培養用のパスツールピペットを用いて培地を細胞集団に強く吹きかけ、細胞を培養面から浮遊させ、新しい培養用フラスコ（ファルコン社製、トラディショナルタイプ・フラスコ No. 3018）に植え継いだ。さらに、培養を継続し、細胞が増えた後に再度新しいフラスコに植え換える操作を繰り返した。この期間中、培地は徐々に継代用の 10% FBS 添加の培地に交換し、以後樹立培養細胞株として継代を繰り返し、細胞を維持した。

#### 【発明の効果】

本発明の昆虫細胞初代培養用培地は、少なくともタンパク質抽出物としてラクトアルブミン水解物、酵母抽出物およびトリプトースリン酸ブロスを、粘性補助剤としてポリビニルピロリドンを含んだ新規な昆虫細胞初代培養用培地であり、本培地を用いることにより短期間で効率的に昆虫の各組織から培養細胞株を樹立することができる。

また、本発明の化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチンは細胞培養容器のコーティングに用いることができ、該コーティングにより細胞は培養容器面に付着し、効率的に増殖・分裂し得る。

さらに、本発明の昆虫細胞初代培養用培地と化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチンを用いて、初代培養を行えばさらに短期間で効率的に細胞株を樹立することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 昆虫細胞初代培養に適した新規な細胞培養用培地、化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチンおよび前記昆虫初代培養用培地および前記昆虫由来の水溶性キチンを用いる、短期間での昆虫培養細胞株の作出法の提供。

【解決手段】 タンパク質抽出物としてラクトアルブミン水解物、酵母抽出物およびトリプトースリン酸ブロス、粘性補助剤としてポリビニルピロリドンを含む昆虫細胞初代培養用培地および化学修飾として脱アセチル化のみされている昆虫由来の水溶性キチン。

【選択図】 なし